DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.151347

潮土农田微生物研究进展*

林先贵 冯有智

(中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘 要 土壤微生物对不同施肥的响应和反馈对于评价和解释科学施肥具有极为重要的意义。本文总结了本课题组在我国华北平原潮土碳、氮、磷循环相关微生物对不同施肥，特别是对单施有机肥的响应方面的研究结果，明确了潮土地力提升过程中的微生物学机制。长期定位试验研究结果表明，长期平衡施肥，特别是施用有机肥能够显著增加潮土中有机碳和养分含量，特别是磷含量，进而改变土壤微生物群落结构，提高微生物生物量碳、转化酶活性、呼吸强度及微生物功能多样性(碳代谢活性)，并且土壤微生物代谢熵与代谢热显著降低。相反，在缺素特别是缺磷条件下，土壤微生物不仅代谢效率低下，而且代谢过程会散逸相对多的热量、排放相对多的 CO_2，导致土壤质量明显下降。长期施用氮肥可增强潮土硝化活性、增加氨氧化细菌的数量和多样性，且无机氮肥比有机氮肥影响更显著；但是，科学施用氮肥的前提是必须合理地添加磷肥，才能更好地促进潮土作物生长、减少氮素损失和提升土壤地力。对于缺磷的潮土，长期施用磷肥，尤其是平衡施肥使得作物对菌根真菌(AMF)依赖性下降，进而导致土壤中 AMF 多样性下降，更多的土壤养分分配给其他微生物，有利于潮土农田地力的可持续性。潮土中一种土著微生物 *Bacillus asahii* 对长期施用有机肥的响应最为显著，该物种需要 2~4 a 会成为潮土中优势微生物，其有着独特的生理特征和丰富的代谢多样性，能够加速和促进其他微生物对潮土有机质累积和磷素循环过程的作用，在作物生长和土壤地力中起到“领军性”的作用。以上认知加深了对长期施用有机肥提升华北平原潮土地力过程中微生物学机制的认识，有助于指导调控土壤微生物更好地服务农田生态系统。

关键词 潮土 微生物 长期施肥 有机肥 磷肥 碳氮磷循环 *Bacillus asahii*
中图分类号: S182; S365 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2016)04-0416-19

Research progresses of farmland microorganisms in fluvo-aquic soil of China*

LIN Xiangui, FENG Youzhi

(Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Responses and feedbacks of soil microorganism to fertilization are important to the evaluation of fertilization effect and establishment of scientific fertilization management. The paper summarized the research results of author’s team in effect of long-term fertilizations, especially single application of organic fertilizer, on soil microorganisms related to the carbon, nitrogen and phosphorus cycling in fluvo-aquic soil. The microbial mechanisms of soil fertility enhancement were also discussed in the paper. The results indicated that for the fluvo-aquic soil in the North China Plain, long term balanced fertilization, especially long term organic fertilization, increased soil contents of organic carbon and other nutrients, the effect was more obvious on soil phosphorus content. This, furthermore, improved soil microorganism community structure, and enhanced soil microbial biomass carbon content, invertase activity, respiration rate and microbial function diversity (carbon metabolic activity), while significantly decreased metabolic quotient and metabolic heat of soil microorganisms. On the contrary, nutritional deficiency, especially phosphorus deficiency, not only decreased metabolic efficiency, but also induced more heat dissipation and CO_2 emission during metabolism of soil microorganisms, which finally decreased soil quality.

* 国家自然科学基金面上项目(41071168)资助
林先贵，主要研究方向为土壤微生物多样性与生态功能。E-mail: xglin@issas.ac.cn
收稿日期: 2015−12−17 接受日期: 2015−12−24

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41071168).
Corresponding author, LIN Xiangui, E-mail: xglin@issas.ac.cn
Received Dec. 17, 2015; accepted Dec. 24, 2015

Long-term application of nitrogen fertilizer enforced soil nitrification activity, and increased amount and diversity of ammonia oxidizing bacteria. Inorganic nitrogen fertilizer was more effective than organic nitrogen fertilizer. In phosphorus-deficient fluvo-aquic soil, rational phosphorus fertilization was essential precondition of scientific application of nitrogen fertilization to promote crop growth and soil fertility, reduce nitrogen loss. Long-term application of phosphorus fertilizer, and balanced fertilization lowered the dependence of crop growth on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), decreased soil AMF diversity and induced differentiation of AMF, which benefited the sustainability of phosphorus-deficient fluvo-aquic soil. An indigenous microorganism of fluvo-aquic soil, *Bacillus asahii* with unique physiological characteristics and abundant metabolic diversity significantly responded to long-term organic fertilization, and could develop to the dominant species during two to four years. *B. asahii* could accelerated other microorganisms in the process of organic matter accumulation and phosphorus recycle in fluvo-aquic soil, played a leading role on crop growth and soil fertility increase. The result was favored for understanding the microbial mechanism of effect of long-term organic fertilization on soil fertility improvement in the North China Plain, and for adjusting soil microorganism to serve farmland ecosystem.
Keywords　Fluvo-aquic soil; Microorganism; Long-term fertilization; Organic fertilizer; Phosphorus fertilizer; Carbon-nitrogen-phosphorus recycle; *Bacillus asahii*

人口的增长，全球气候的变化以及粮食消费结构的调整等因素使得粮食安全已成为当前及未来人类面临的一大问题。如果不能保证持续增产，粮食供给将成为制约世界经济发展和社会稳定的最为重要和最为直接的问题。肥料是粮食的“粮食”，业已证明，在所有增产因子中只有施肥量与粮食产量呈现线性正相关关系。但是不合理的施肥会造成肥料利用率低下，对土壤和环境造成重大的破坏[1]。因此，只有科学施肥才是实现粮食增产的最有效途径，我们必须树立起科学施肥的观念，努力提高化肥利用率，促进农业生产可持续发展。

科学施肥必须要有科学的依据。长期定位试验研究方法是不可替代的手段之一。在农业生态系统中有很多生态过程的进展相当缓慢，短期试验不一定能揭示生态过程的变化趋势，因此长期定位试验在促进生态学理论的发展、揭示生态过程的演变机制、提供科学合理的施肥参数和资源优化管理等方面具有重要意义。英国洛桑试验站是世界上最早开展土壤长期定位试验的研究机构，已有 170 年的历史，被称之为“经典田间试验”(图 1)。从 20 世纪 80 年代起，我国也陆续建立了一批涉及生态系统结构、功能和生态过程动态研究的长期定位试验。1983 年中国科学院封丘农业生态试验站开始建立了长期定位试验，1989 年秋季开始建立了肥料长期定位试验，试验共设 7 个肥料处理，包括：不施肥对照(Control)、有机肥(OM)、有机无机肥配施(1/2OMN)和施用化肥(NPK、NP、NK 和 PK)。迄今，中国科学院封丘农业生态试验站长达 20 多年肥料长期定位试验的数据显示，有机无机肥配施(1/2OMN)和 NPK 等平衡施肥能显著增加潮土农田玉米和小麦的

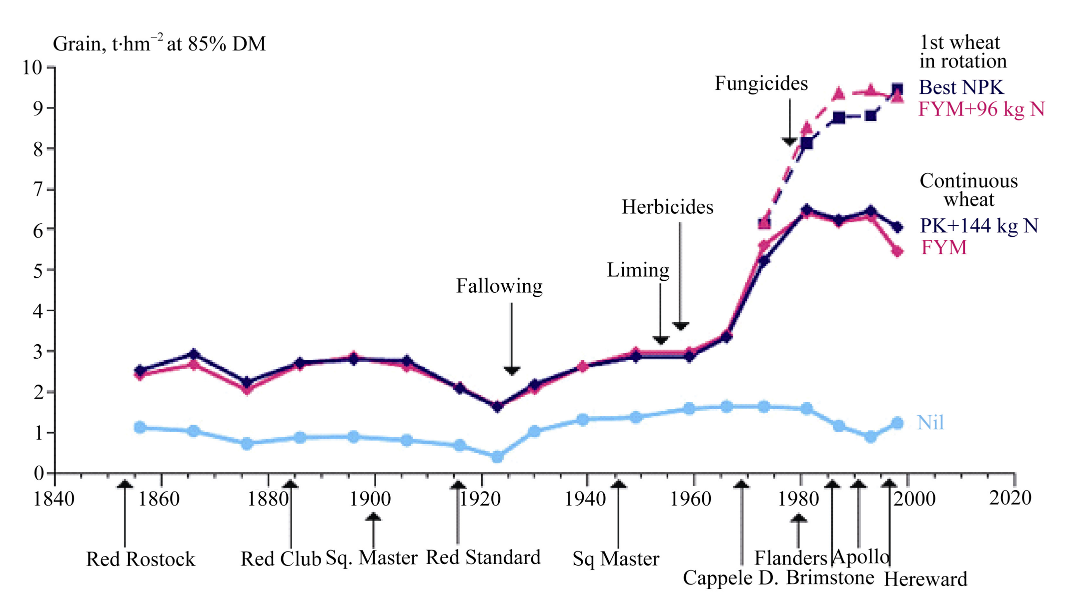


图 1　英国洛桑试验站 **160** 年间作物产量变化图

Fig. 1　Crop yield change during 160 years from 1840 to 2000 in Rothamsted Station in UK (from Rothamsted Research, 2006)

产量[2]；此外，单施有机肥也具有显著的增产效果，特别是玉米季表现更明显。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分，它们参与土壤有机质分解、腐殖质形成、土壤养分转化和循环等过程。土壤微生物群落结构组成及活性变化是衡量土壤质量、维持土壤地力和作物生产力的一个重要指标。因此，土壤微生物对不同施肥的响应和反馈对于评价和解释科学施肥具有极为重要的意义。本课题组从潮土碳、氮、磷循环 3 个方面，系统地研究了相关微生物对不同施肥，特别是对单施有机肥的响应，在此基础上进一步明确了潮土地力提升过程中的微生物学机制。

1 长期不同施肥对潮土碳转化过程微生物的影响

碳源是微生物生长最基本的物质之一；微生物分解有机质获得能源，发挥生态功能。科学施肥不仅提高作物产量，还增加土壤有机碳含量，必将影响土壤微生物功能和多样性。因此，我们首先以碳循环相关微生物入手，从土壤微生物生物量碳、酶活性和碳源利用能力，以及群落结构等多个层面展开研究。

1.1 长期不同施肥对潮土微生物生物量碳、酶活性与代谢活力的影响

土壤微生物生物量是土壤有机质中最活跃和最易变化的部分，对植物养分具有贮存和调节作用，其大小和活性直接影响养分的矿化、固定以及土壤酶的活性。土壤转化酶活性与土壤有机质含量等有关，是表征土壤生物活性强度和评价土壤熟化程度的一个重要指标，而脱氢酶则反映微生物新陈代谢的整体活性，因而通常以脱氢酶活性除以微生物碳换算获得微生物代谢活力。不同施肥处理土壤微生物生物量碳、转化酶与脱氢酶活性及微生物代谢活力如图 2 所示[3−4]。施用有机肥处理中土壤微生物生物量碳(图 2A)与酶活性(图 2B，2C)均是最高，1/2OMN 处理次之，化肥施用中含有磷素的施肥要高于缺磷施肥，NK 处理与对照(Control)相比没有明显变化。微生物代谢活性的结果表明，有机肥和 NPK 等平衡施肥能够提高土壤微生物的代谢活性(图 2D)。

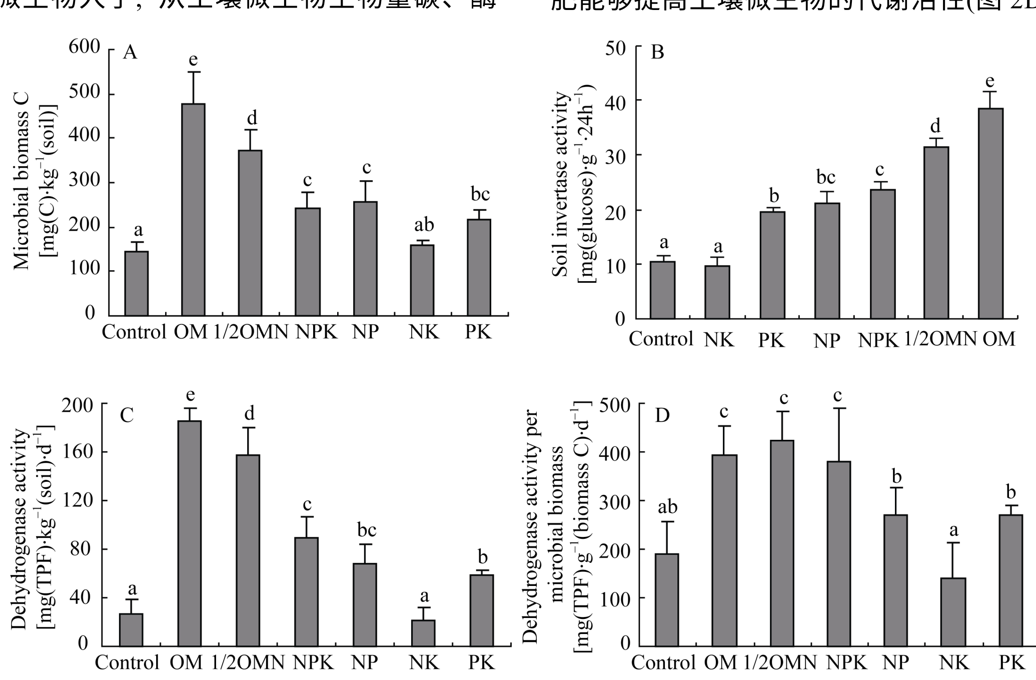


图 2 不同施肥处理下潮土微生物生物量碳(A)、转化酶(B)与脱氢酶活性(C)及微生物代谢活力(D)的比较

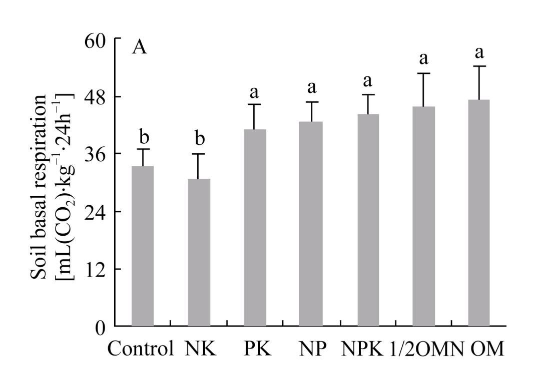
Fig. 2 Comparisons of soil microbial biomass carbon (A), invertase activity (B), dehydrogenase activity (C) and microbial metabolic activity (D) in fluvo-aquic soil among different fertilization treatments

Control：不施肥对照；OM：施有机肥；1/2OMN：有机无机肥配施；NPK：施用化肥 NPK；NP：施用化肥 NP；NK：施用化肥 NK；PK：施用化肥 PK。不同小写字母表示施肥处理间在 $P<0.05$ 水平差异。下同。Control: no fertilization; OM: organic fertilizer application; 1/2OMN: combined application of chemical and organic fertilizers; NPK: combined application of chemical nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers; NP: combined application of chemical nitrogen and phosphorus fertilizers; NK: combined application of chemical nitrogen and potassium fertilizers; PK: combined application of chemical, phosphorus and potassium fertilizers. Different small letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level. The same below.

1.2 长期不同施肥对潮土微生物代谢熵与代谢热的影响

土壤呼吸强度指土壤吸收 O_2 和释放 CO_2 的强度，而微生物活动是土壤呼吸的主要来源，所以土壤呼吸强度可表征土壤微生物总代谢能力；而它与微生物生物量的比值又被称为代谢熵，是衡量土壤生态

系统演化与健康的重要指标。不同施肥处理下的土壤基础呼吸强度与代谢熵如图 3 所示[4]。与 Control 相比, 所有施磷处理下土壤基础呼吸强度均显著升高(图 3A)、微生物代谢熵则显著下降(图 3B), 其中施有机肥处理(1/2OMN 和 OM)变化尤为突出。该现象说明施用有机肥可使土壤微生物更“高效低排”地为生态系统服务, 即土壤健康质量得到显著提升。缺失磷肥的 NK 处理与 Control 代谢熵最高, 说明微生物代谢受到严重的缺素胁迫(尤其指磷)。



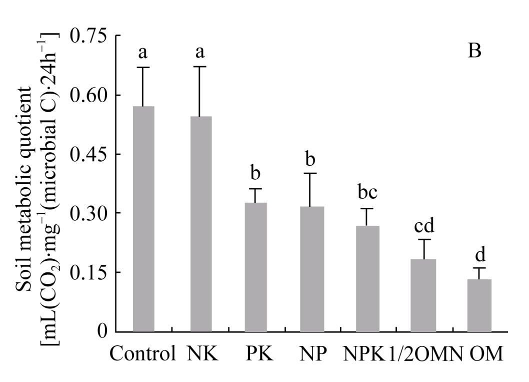
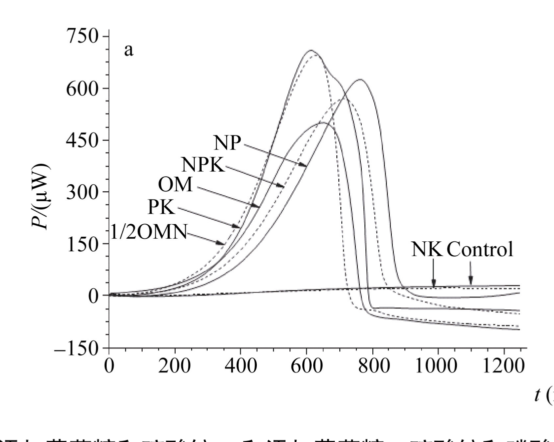


图 3　不同施肥处理下土壤基础呼吸强度(A)与微生物代谢熵(B)的比较

Fig. 3　Comparisons of soil basic respiration rate (A) and microbial metabolic quotient (B) in fluvo-aquic soil among different fertilization treatments

生命体的新陈代谢过程必然产生热, 因此释放的热量可以代表一个生命体的活跃状态。微热量仪可以灵敏地检测环境热量的变化, 并已应用于土壤等复杂体系中微生物代谢活动的测定。微量热表征土壤微生物代谢活动状况有多项核心指标: 微生物生长速率、总代谢热、热释放峰值和出峰时间。在比较短的时间内到达高的热释放峰值, 则代谢活性强。常规方法下曲线分延滞、上升、平稳、降落等 4 个阶段。利用微量热技术对长期不同处理下潮土微生物生长速率等因子进行研究发现, 在缺磷处理(Control、NK)中土壤微生物生长速率慢, 它们的热动力学曲线近似“死线”, 具体表现为其微生物热释放值低、出峰时间晚(图 4a 和表 1)[5]。该现象说明潮土严重缺磷几乎可以抑制微生物代谢活性。同时, Control 和 NK 处理中土壤微生物总代谢热高(表 1), 说明在缺磷环境中土壤微生物所做的无用功较多, 能耗高, 不利于减排效应。此外, 通过添加磷源的方式, 可以使 NK、Control 处理受到明显的激活(图 4b)。因此说明潮土中磷素是限制土壤微生物活性的重要因子。



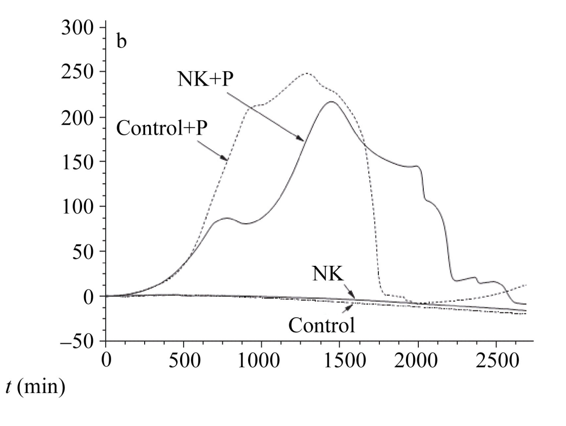


图 4　添加葡萄糖和硫酸铵(a)和添加葡萄糖、硫酸铵和磷酸二氢钠(b)后不同施肥处理潮土土壤微生物代谢热动力学曲线

Fig. 4　Thermokinetic curves of soil microbial metabolism with addition of glucose and ammonium sulfate (a) and glucose, ammonium sulfate and sodium dihydrogen phosphate (b) in fluvo-aquic soil under different fertilization treatments

单个细胞的热散逸量(Q_T/N_0)是衡量土壤微生物活性的有力指标。图 5 显示 NK、Control 处理下单个细胞热散逸量显著高于平衡施肥。长期平衡施肥下, 潮土单位微生物热释放值(代谢熵)低。该结果表明含磷施肥(特别是平衡施肥)能够促进潮土的“增汇减排”效应。

表 1 不同施肥处理下潮土微生物热释放峰值、出峰时间、总代谢热和生长速率

Table 1 Parameters of thermokinetics of soil microorganisms in fluvo-aquic soil under different fertilization treatments

处理 Treatment	最大热功率(P_{max}) Max thermal power (μW)	最大热功率的出峰时间(t_{max}) Occurrence time of P_{max} (min)	总代谢热(Q_T) Total metabolic heat (J·g^{-1})	生长速率(k) Growth rate (min^{-1})
Control	259.73±5.55B	1 353.50±40.99C	12.89±0.88D	0.004 9±0.000 9A
NK	198.35±21.70A	1 515.25±40.13D	12.08±3.57CD	0.003 1±0.000 5A
PK	679.88±85.97E	583.50±83.58A	10.61±0.49C	0.010 7±0.000 6B
NP	627.58±93.29DE	694.88±120.16B	9.66±0.61BC	0.011 1±0.003 8B
NPK	538.87±35.66CD	700.75±14.72B	8.83±0.09AB	0.009 0±0.002 7B
1/2OMN	611.87±96.08DE	674.25±53.98AB	9.71±2.08BC	0.009 4±0.000 1B
OM	478.28±14.78C	577.38±89.37A	7.74±0.16A	0.008 8±0.001 1B

同列不同大写字母表示不同处理间在 P<0.05 水平差异显著。表 2 表 3 同。Different capital letters indicate significant difference at P < 0.05 level among fertilization treatments. The same as the table 2 and 3.

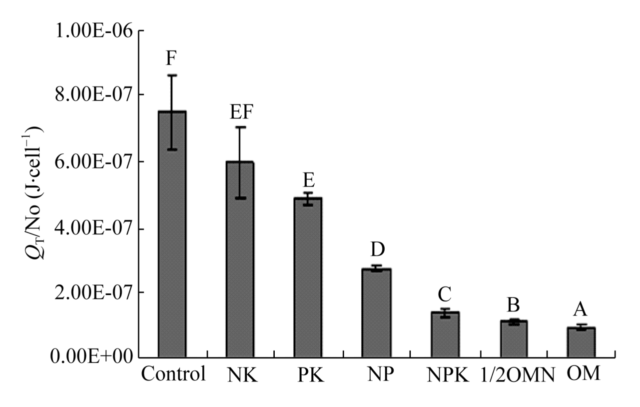


图 5 不同施肥处理下潮土微生物单个细胞的热散逸量

Fig. 5 Heat dissipation capacity (Q_T/N_0) of single cell of soil microorganism in fluvo-aquic soil under different fertilization treatments

不同大写字母表示不同处理间在 P<0.05 水平差异显著。N_0 为微量热测定前的土壤微生物数量。Different capital letters indicate significant difference at P < 0.05 among fertilization treatments. N_0 indicates the initial numbers of soil microorganisms before the calorimetric test.

1.3 长期不同施肥对潮土微生物碳代谢功能多样性的影响

BIOLOG ECO 板采用类土壤微生物碳源的组分，被广泛用来研究土壤微生物群落功能多样性。由表 2 可知，平衡施肥提高了土壤微生物碳的利用能力与功能多样性；NP 处理也能显著提高香农(Shannon)与辛普森(Simpson)指数[4]。PCA 分析显示(图 6a)，在 PC1 因素上，施磷处理与对照(Control)显著分开，施有机肥处理与缺素施肥处理(NP、PK 和 NK)显著分开，NPK 和 NP 也与 NK 显著分开。冗余分析(redundancy analysis，RDA)进一步显示(图 6b)，施用有机肥大幅提高土壤微生物生物量与转化酶活性，其原因是施用有机肥增加了土壤有机碳和全氮含量；施有机肥或磷肥显著提高土壤微生物多样性和代谢活性，多样性指数也与有机碳和全氮含量显著相关。施有机肥或磷肥显著降低土壤微生物代谢熵，与有机碳、全氮含量及微生物多样性指数和碳源利用活性等均呈显著负相关。以上结果综合表明施用有机肥能够改善潮土微生物功能。

表 2 不同施肥处理下潮土微生物碳源利用活性(AWCD)与功能多样性指数

Table 2 Carbon resources utilization activities (AWCD) and function diversity indexes of soil microorganisms in fluvo-aquic soil under different fertilization treatments

处理 Treatment	AWCD	Shannon 指数 Shannon index (H')	Simpson 指数 Simpson index (D)	McIntosh 指数 McIntosh index (U)
Control	0.54±0.09C	2.95±0.20B	16.91±3.37C	4.08±0.35C
NK	0.54±0.08C	2.95±0.13B	16.73±2.27C	4.11±0.37C
PK	0.65±0.06BC	3.12±0.07AB	19.52±1.87BC	4.59±0.31BC
NP	0.69±0.03BC	3.16±0.04A	20.70±1.03AB	4.72e0.24BC
NPK	0.79±0.17AB	3.17±0.05A	21.45±1.75AB	5.27±0.89AB
OM	0.77±0.08AB	3.23±0.05A	23.00±1.35AB	4.99±0.39AB
1/2OMN	0.90±0.14A	3.26±0.05A	23.76±1.85A	5.71±0.68A

1.4 长期不同施肥对潮土微生物结构多样性的影响

磷脂脂肪酸(PLFA)分析技术既可表征微生物生物量，也可反映土壤微生物群落结构。如图 7a 所示，相对于缺素施肥和不施肥，平衡施肥(OM、1/2OMN 和 NPK)提高了土壤微生物生物量与结构多样性，而且施用有机肥的效果优于施用化肥。PLFA 分析还显示真菌和革兰氏阳性细菌较革兰氏阴性细菌、放线

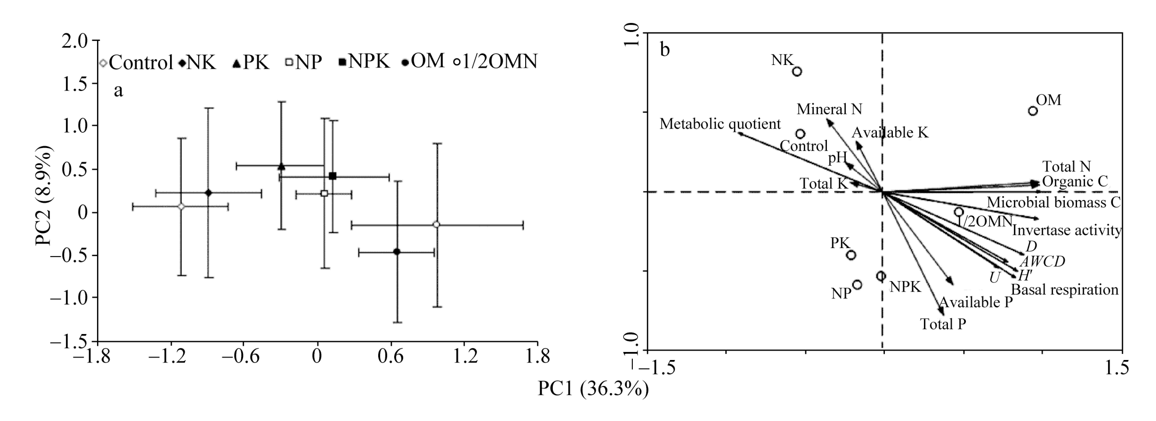


图 6　不同施肥处理下潮土微生物碳源利用主成分分析(PCA)(a)和冗余分析(RDA)(b)

Fig. 6　Principal component analysis (a) and redundancy analysis (b) of soil microorganism carbon sources utilization in fluvo-aquic soil under different fertilization treatments

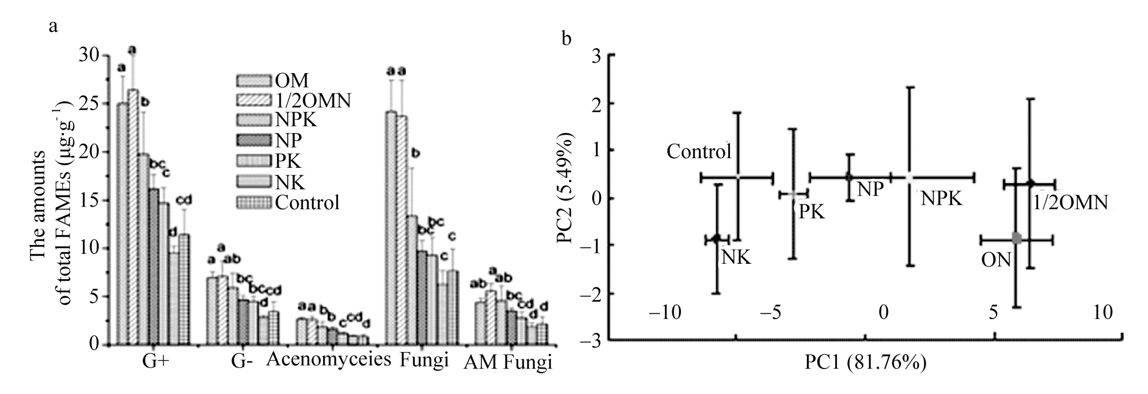


图 7　不同施肥处理下潮土微生物结构多样性(生物量)(a)及其主成分分析(PCA)(b)

Fig. 7　Principal component analysis (a) and redundancy analysis (b) of structure diversity of soil microorganism in fluvo-aquic soil under different fertilization treatments

菌和丛枝菌根真菌对平衡施肥的响应更为敏感。PCA 分析进一步显示(图 7b), PC1 因素对潮土微生物群落结构分异的贡献率为 81.76%，即横坐标是主要的分异因素：施用有机肥处理(OM 和 1/2OMN)与施用化肥处理显著分开；此外，含磷的化肥施用(NPK、NP 和 PK)与缺乏磷素处理(Control 和 NK)显著分开。

1.5　长期不同施肥对潮土微生物遗传多样性的影响

为了高分辨率地展示长期不同施肥对潮土微生物群落的影响，我们进一步利用 Illumina 的 Miseq 测序技术对不同施肥潮土中细菌 16S rRNA 基因进行了高通量测序分析。测序共得到 159 455 条序列，每个土壤样品获得 15 191~33 266 条细菌 16S rRNA 基因序列。基于 97%的相似性，159 455 条序列共形成 47 207 个 OTUs，每个 DNA 样品分别形成 6 996~14 224 个 OTUs(表 3)。各样品文库的覆盖率达 65%~69%，基本能够反映样品细菌群落结构的真实情况。

长期不同施肥处理对潮土细菌遗传多样性有显著影响(表 3)。长期不同施肥对潮土细菌的 Shannon 指数和 PD 指数的影响规律一致，即 PK 处理最高，缺乏磷素处理(NK)最低。施用有机肥处理(OM 和 1/2OMN)及 NPK 处理的 Shannon 指数均低于对照

表 3　长期不同施肥处理下潮土细菌 **Alpha** 多样性指数

Table 3　Alpha diversity indexes of soil bacteria in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

处理 Treatment	测序总量 Total sequencing number	OTUs	覆盖率 Cover rate (%)	Shannon 指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index	PD
OM	27 188	11 480	68.7	9.84±0.01	6 688.64±682.20	136.16±1.17
1/2OMN	23 617	10 510	66.3	9.85±0.06	7 923.97±1075.92	138.41±2.29
NPK	16 493	7 644	64.8	9.90±0.09	6 400.25±440.78	138.95±1.47
NP	23 712	9 957	68.9	10.01±0.10	7 760.63±310.83	144.03±1.00
NK	15 191	6 996	65.6	9.70±0.07	6 075.89±589.54	132.60±3.33
PK	33 266	14 224	68.7	10.08±0.03	7 861.34±599.20	149.89±2.68
Control	19 988	9 016	66.0	9.93±0.04	6 754.03±538.40	140.09±1.61

(Control)及其他缺素施肥处理(NK 除外)，而缺素施肥处理 NP 和 PK 则显著高于 NK 和 Control。与上述两个指数不同的是，1/2OMN 处理的 Chao1 指数最高，PK 及 NP 其次，而 NK 处理的 Chao1 指数最低。缺素施肥处理中，施用磷肥处理的 Chao1 指数显著高于缺 P 处理。

潮土中优势细菌(相对丰度>5%)主要为酸杆菌纲(Acidobacteria)、放线菌(Actinobacteria)、拟杆菌(Bacteroidetes)、厚壁菌(Firmicutes)、α-变形菌(Alphaproteobacteria)和 β-变形菌(Betaproteobacteria)，占总序列的 62%(图 8)。另外，绿弯菌(Chloroflexi)、硝化螺菌(Nitrospira)、浮霉菌(Planctomycetes)、γ-变形菌(Gammaproteobacteria)、δ-变形菌(Deltaproteobacteria)和其他变形菌(Proteobacteria)以及其余 12 个细菌种群以较低的相对丰度存在于潮土中。菌群变形菌和拟杆菌在 NK 处理和 Control 处理中所占的比例明显低于其他处理。这说明长期缺磷施肥显著降低了潮土细菌菌群变形菌和拟杆菌的比例。厚壁菌在 OM 和 1/2OMN 处理中所占的比例上升。这说明有机肥的长期施用提高了潮土厚壁菌数量。

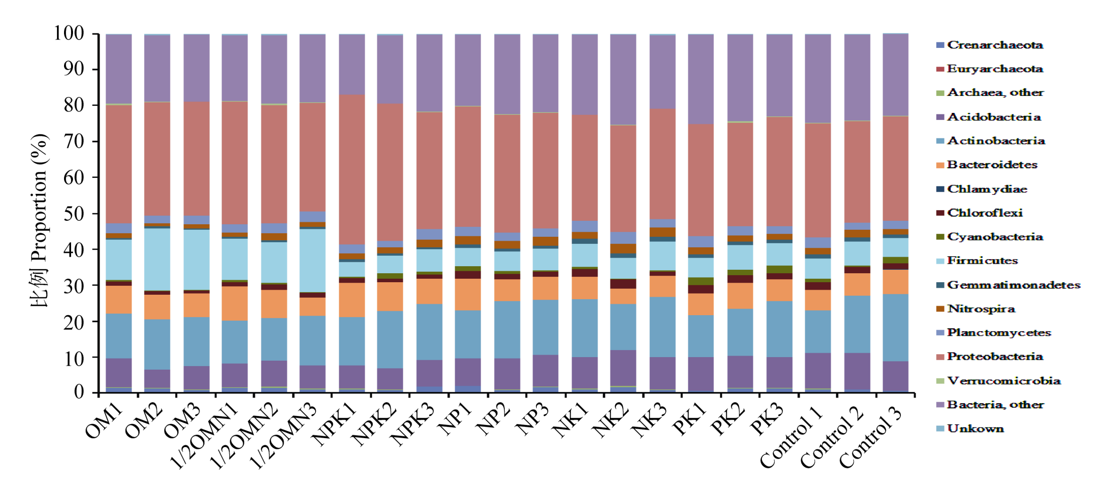


图 8 长期不同施肥处理下潮土细菌的群落结构组成

Fig. 8 Structural composition of bacterial communication in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

基于 2 000 条细菌 16S rRNA 基因序列，我们进行了 PCA 分析(图 9a)和非度量多维尺度分析(nonmetric multidimensional scaling, NMDS)(图 9b)，可视化地展示了潮土细菌群落结构对不同施肥的响应。PCA 分析显示施用有机肥处理与施用化肥处理在 PC1 上能够显著分开(图 9a)。基于 Unifrac 距离的 NMDS 分析得到了与 PCA 分析一致的结果，即平衡施肥(OM、1/2OMN 和 NPK)能够显著改变潮土细菌的群落分布，此外磷肥的施用也促进了缺素施肥潮土中土壤细菌种群的梯度演替(图 9b)。由此可见，潮土中碳、磷含量是影响潮土细菌群落分布的主要因素。

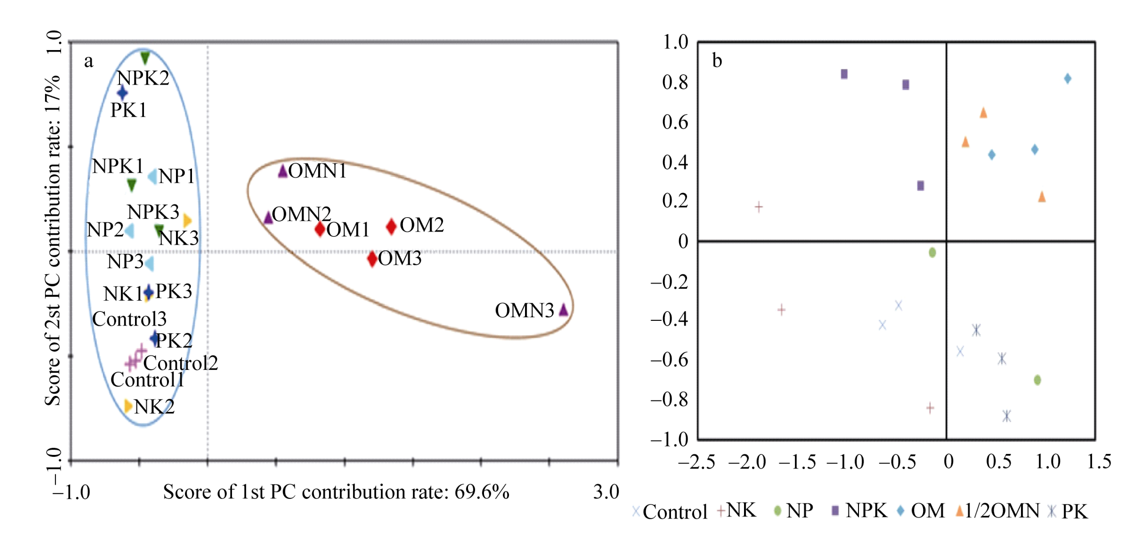


图 9 不同施肥处理下潮土细菌群落结构分异的 PCA 分析(a)和 NMDS 分析(b)

Fig. 9 Principal component analysis (a) and nonmetric multidimensional scaling analysis (b) of structural differentiation of bacterial communication in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

1.6　小结

对于我国华北平原的潮土，长期平衡施肥，特别是施用有机肥能够显著增加土壤有机碳和养分含量，特别是磷含量，进而改变了土壤微生物群落结构，提高微生物生物量碳、转化酶活性、呼吸强度及微生物功能多样性(碳代谢活性)，并且土壤微生物代谢熵与代谢热显著降低。土壤微生物的响应表明平衡施肥下，它们能够“高效低排”地为生态系统服务，并保障土壤养分转化与作物养分吸收，使得土壤综合碳汇效应明显；相反，在缺素特别是缺施磷肥条件下，土壤微生物不仅代谢效率低下，而且代谢过程会散逸相对多的热量、排放相对多的 CO_2，会导致土壤质量明显下降。

2　长期不同施肥对潮土氮转化过程微生物的影响

氮素是农田生态系统最重要的养分之一，它对作物和微生物的生长以及生态功能的发挥都有重要的作用。长期不同施肥影响了潮土碳循环，也必将改变氮转化过程。土壤微生物是农田生态系统氮素转化的驱动者，例如氨氧化微生物是氮循环限速步骤氨氧化的执行者。因此，长期不同施肥必将影响氮循环相关微生物多样性和功能。在本研究内容中，除了研究氮素取向和氮相关微生物特性外，我们重点揭示氨氧化微生物对不同施肥的响应。

2.1　长期不同施肥对土壤全氮及其 ^{15}N 丰度的影响

在封丘潮土农田生态系统养分平衡长期定位施肥试验运行近 20 a 后，不同施肥处理土壤的总氮含量如图 10 所示，平衡施肥处理 OM、1/2OMN 和 NPK 土壤全氮含量显著高于缺素施肥处理 NK、PK 及不施肥处理 Control[6]。与 1989 年长期试验开始时的土壤全氮含量 0.45 $g\cdot kg^{-1}$ 相比(表 4)，平衡施肥处理 OM、1/2OMN 和 NPK 显著增加土壤全氮含量，经过 18 a 增幅分别为 148%、79%和 32%。施用有机肥处理 OM 和 1/2OMN 向土壤中施入了大量有机氮，因此土壤全氮含量显著高于 NPK 处理(表 4)。此外，由于封丘潮土本身富钾而缺磷，因此 NP 处理对土壤全氮的影响与 NPK 处理相似。

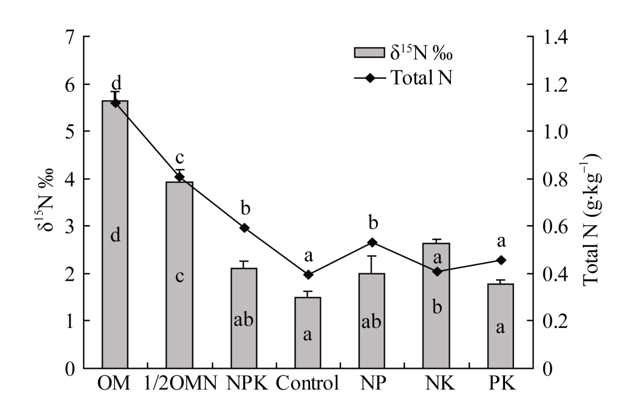


图 10　长期不同施肥对潮土全氮及 ^{15}N 丰度的影响

Fig. 10　Soil total nitrogen content and ^{15}N abundance in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

值得关注的是缺施磷肥的 NK 处理，尽管长期向土壤中施入氮肥，但土壤全氮含量与长期不施肥对照(Control)相似，低于 18 a 前，降幅达 8.8%(表 4)。同时，还可以发现，缺施磷肥的NK处理中土壤全氮的丰度显著高于 Control 处理。究其原因，NK 处理中土壤 pH 较高，容易造成氨挥发从而加剧氮素的分馏；同时，由于土壤缺磷严重抑制了作物的生长，导致大量的无机氮存留于土壤中，加剧了其他形式氮的损失，尤其是能导致氮素分馏的气态氮损失，如反硝化产生 N_2O、氨挥发等。因此从氮素高效利用和环境保护角度出发，在缺磷土壤中，必须在施用氮肥的基础上合理添加磷肥才能更好地促进作物生长和减少氮素损失。

表 4　长期施肥潮土土壤全氮含量与试验开始时比较结果

Table 4　Comparison in soil total nitrogen content in 2007 and 1989 under different long-term fertilization treatments in fluvo-aquic soil

1989 年全氮含量 Total nitrogen content in 1989 ($g\cdot kg^{-1}$)	2007 年 Year 2007		
	处理 Treatment	与 1989 年差异显著性 Significance of difference with 1989	增减幅度 Change rate (%)
0.45	OM	*	148
	1/2OMN	*	79
	NPK	*	32
	NP	*	18
	PK	n.s	1
	NK	*	−9
	Control	*	−12

表示在 P<0.05 水平差异显著，n.s 指差异不显著。 means significant difference at P < 0.05 level. n.s means not significant difference.

2.2　长期不同施肥对土壤微生物生物量氮与脲酶活性的影响

平衡施肥，特别是施用有机肥增加了土壤有机氮的输入，促进了土壤微生物生长进而提高了土壤微生物生物量氮与脲酶活性，且有机肥比无机肥的影响更显著(图 11)。施用化肥处理中，NPK 平衡施肥处理能显著增加土壤微生物量氮和脲酶活性，NP 处理也显著提高脲酶活性，而缺氮或缺磷处理的作用均没有达到显著水平。缺施磷肥的 NK 处理不仅脲酶活性未显著提高(图 11B)，微生物生物量氮甚至趋

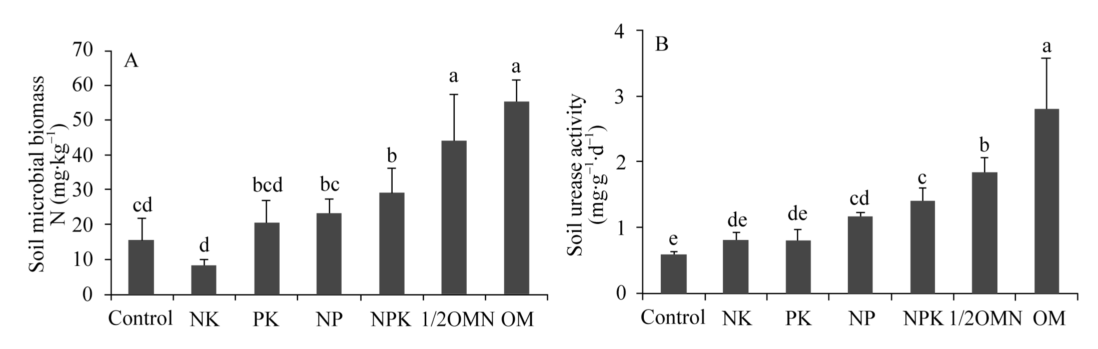


图 11 长期不同施肥对潮土微生物生物量氮(A)与脲酶活性(B)的影响

Fig. 11 Effects of different long-term fertilization treatments on soil microbial biomass nitrogen content (A) and urease activity (B) in fluvo-aquic soil

于下降(图 11A)。该现象与表 4 中 NK 处理中土壤全氮含量下降相一致，也说明在缺磷土壤中，必须在施用氮肥的基础上合理添加磷肥才能更好地促进作物生长和维持地力。

2.3 长期不同施肥对土壤硝化作用强度和氨氧化细菌数量的影响

从图 12 可以发现，施用氮肥极大地增强了土壤硝化活性，其中无机氮肥比有机氮肥影响更显著，又以平衡施用 NPK 处理的效果最显著，缺施氮肥的土壤硝化活性与对照(Control)没有显著差异[7]。此外，氮肥的施用还极大地提高了土壤氨氧化细菌的数量，且无机氮肥比有机氮肥影响更为显著(图 13A)[8]。有机肥料中的氮主要以有机氮形式存在，不能直接被植物利用，需要经土壤微生物矿化，因此其有效性明显低于化肥，所以 NPK 施肥的土壤硝化强度最大和氨氧化细菌的数量最多。但是，单个细胞的硝化强度则是有机氮肥显著高于无机氮肥(图 13B)。缺施氮肥土壤氨氧化细菌数量及其活性与对照(Control)没有显著差异。

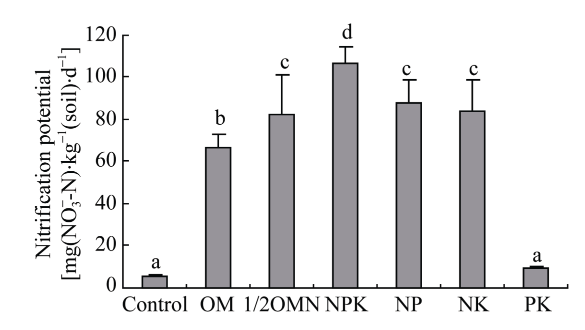
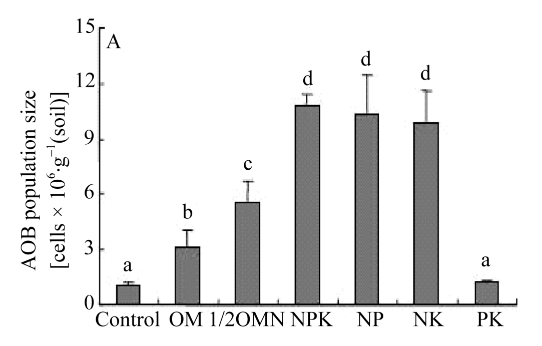


图 12 长期不同施肥对土壤硝化作用强度的影响

Fig. 12 Effects of different long-term fertilization treatments on soil nitrification intensity in fluvo-aquic soil



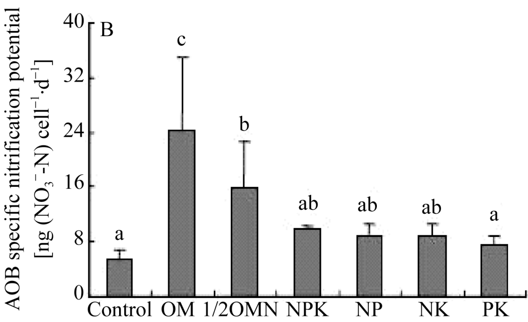


图 13 长期不同施肥对土壤氨氧化细菌数量(A)和单个细胞硝化活性(B)的影响

Fig. 13 Effects of different long-term fertilization treatments on amount of ammonia oxidizing bacteria (A) and nitrification activity of single cell (B) in fluvo-aquic soil

2.4 长期不同施肥对土壤氨氧化细菌群落结构的影响

氨氧化细菌是土壤氮素转化的关键微生物，前面的研究结果一致显示氮肥的施用，特别是平衡施肥对土壤氮素转化、酶活、微生物生物量氮和氨氧化细菌等都存在很大影响。那么氨氧化细菌群落的多样性如何变化？哪些氨氧化细菌更为敏感？利用 PCR-DGGE 技术靶标编码氨单加氧酶α亚基的功能基因 *amoA* 来分析氨氧化细菌的群落结构[7]。DNA 指纹图谱表明施氮处理的 DGGE 条带数增多(图 14a)，说明施氮处理使得氨氧化细菌具有更高的多样性。与此同时，对照(Control)处理中一个显著的特征条带(条带 3)在所有施肥处理中消失。测序结果表明施氮肥使不可培养亚硝化螺菌属(Nitrosospira Cluster 3)成为优势菌属(图 14b)。这个物种可能在潮土氮素转化过程中起着关键性作用。

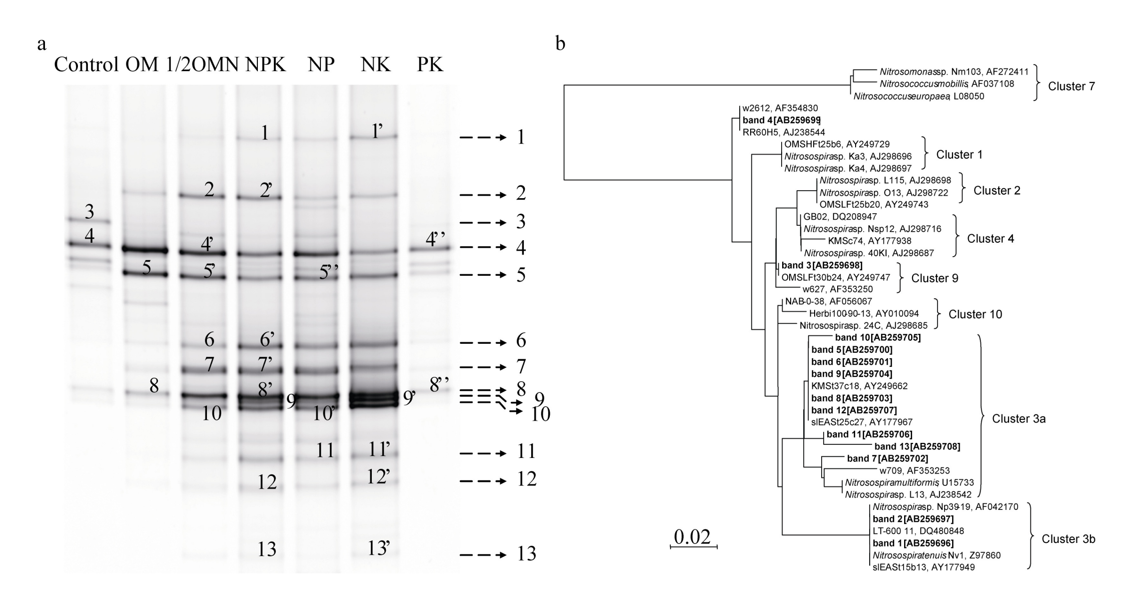


图 14　长期不同施肥下潮土氨氧化细菌的指纹图谱(a)和系统发育树分析(b)

Fig. 14　PCR-DGGE Fingerprint Spectrum (a) and phylogenetic tree (b) of ammonia oxidizing bacteria in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

2.5　小结

长期平衡施肥能够显著提高土壤全氮含量、微生物生物量氮和脲酶活性等; 施用氮肥极大地增强了土壤硝化活性、氨氧化细菌数量和多样性, 且无机氮肥比有机氮肥影响更显著, 而缺施氮肥的土壤中氨氧化细菌数量及其活性与对照没有显著差异。值得注意的是, 对于缺磷的潮土而言, 科学施用氮肥的前提是必须合理地添加磷肥, 才能更好地促进作物生长、减少氮素损失和提升土壤地力。这些发现有助于指导我们今后科学施肥, 提高华北平原氮肥利用率和增产效果, 同时也可缓解农田氮素损失及其对环境的压力。

3　长期不同施肥对潮土磷转化过程微生物的影响

土壤微生物间存在“生物地下交易”法则。科学施肥增加土壤养分, 通过“地下交易”过程影响土壤微生物多样性和功能。由于潮土缺磷, 肥料中磷素的添加会对于潮土磷素转化微生物的多样性和功能产生影响。根据“生物地下交易”法则, 我们选择了与磷素循环紧密相关的丛枝菌根真菌(Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF)进行研究。

3.1　长期不同施肥对丛枝菌根真菌孢子多样性的影响

AMF 是陆地生态系统中关键微生物。它们主要参与磷素的生物地球化学循环过程, 能与 90%以上的陆地植物形成互惠共生体。通过“生物地下交易”法则, 植物和 AMF 进行着物质和能量的交换: 植物将光合产物以碳源的形式输送给 AMF。作为反馈, AMF 为植物吸收更多的磷素等养分, 以促进植物生长。此外, 宿主植物会根据环境的变化, “选择性”地放弃某些 AMF, 并将更多的光合产物分配给其他微生物, 以促进土壤地力的可持续性发展。因此, AMF 群落的变化不但可以表征土壤质量和健康, 还可以敏锐地反映土壤生态系统的变化。

首先利用蔗糖离心–湿筛倾析法分离孢子, 在体视显微镜下观察 AMF 孢子的多样性[9]。发现施用有机肥显著降低了 AMF 孢子的物种丰富度, 其平均物种数从对照(Control)的 22.8 下降到 15.3(OM)和 16.3(1/2OMN)(表 5)。相似度分析显示(图 15), Control 和 NK 处理中 AMF 孢子多样性的相似度最高, 形成一个分支和其他的施肥处理分离。该现象说明磷肥的施用对土壤中 AMF 的多样性有较大影响。

表 5　长期不同施肥处理对潮土丛枝菌根真菌孢子多样性的影响

Table 5　Effects of different long-term fertilization treatments on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi spore in fluvo-aquic soil

处理 Treatment	孢子密度 Spore density [sporeS·25g^{-1}(soil)]	平均种类数 Average species number	4 个重复的总种数 Total species number of 4 replicates
Control	269ab	22.8c	27
NK	295bc	16.0ab	20
PK	360cd	17.0ab	19
NP	380d	16.8ab	22
NPK	390d	18.8b	23
OM	216a	15.3a	18
1/2OMN	235ab	16.3ab	18

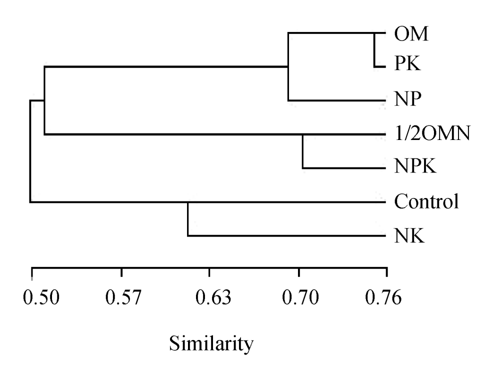


图 15 长期不同施肥处理下潮土丛枝菌根真菌孢子多样性的聚类分析

Fig. 15 Clustering analysis of arbuscular mycorrhizal fungi spore in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

3.2 长期不同施肥对丛枝菌根真菌遗传多样性的影响

由于传统观察法对 AMF 多样性的鉴定存在一定的主观性和片面性，为客观、全面地揭示长期不同施肥对潮土中 AMF 群落的影响，2011 年本课题组在国内外较早地利用 454 高通量基因测序技术研究了 AMF 群落对不同施肥的响应[10]。通过高通量测序，共获得 59 611 个 AMF 的特异性片段序列，形成 70 个 OTUs(图 16a)，其中主要分布在 2 个科 Glomeraceae (52 130 条序列，形成 55 个 OTUs)和 Gigasporaceae (4 334 条序列，3 个 OTUs)(图 16b)。

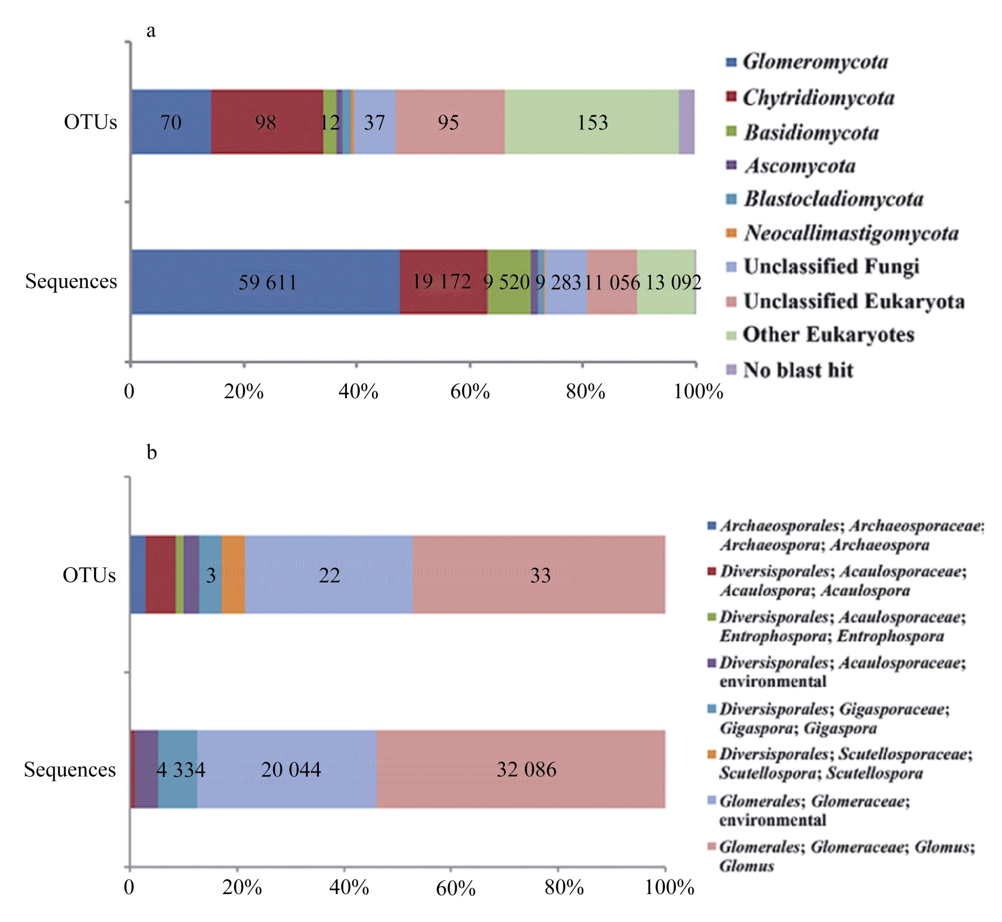


图 16 潮土中优势真菌(a)和丛枝菌根真菌群落(b)组成

Fig. 16 Compositions of dominant communities of fungi (a) and arbuscular mycorrhizal fungi (b) in fluvo-aquic soil

我们绘制了系统发育多样性(phylogenetic diversity, PD)指数、Shannon 指数、可能最大物种数(Chao1)和可观察到的物种数(observed species)4 个多样性指数的稀释性曲线来比较不同施肥间 AMF 多样性的差异(图 17)。稀释性曲线显示当潮土中 AMF 测序量超过 1 000 条序列时，4 个多样性指数均趋于稳定，变幅减小，即说明本研究的测序量可以涵盖潮土中 AMF 的全部物种。不同施肥间多样性指数的比较发现磷肥的施用降低了潮土中 AMF 多样性：和 NK 和对照(Control)相比，NP、NPK 和 OM 处理显著降低了 AMF 的 PD 和 Shannon 多样性指数，以及 Chao1 和观察到的物种的数量。具体而言，NP、NPK 和 OM 处理的 PD 和 Shannon 指数从 NK 和对照的 2.0~4.0 降到 1.7~3.0；Chao1 和观察到的物种数从 42~38 降到 35。此外，NP、NPK 和 OM 处理间的 AMF 多样性指数并没有差异。

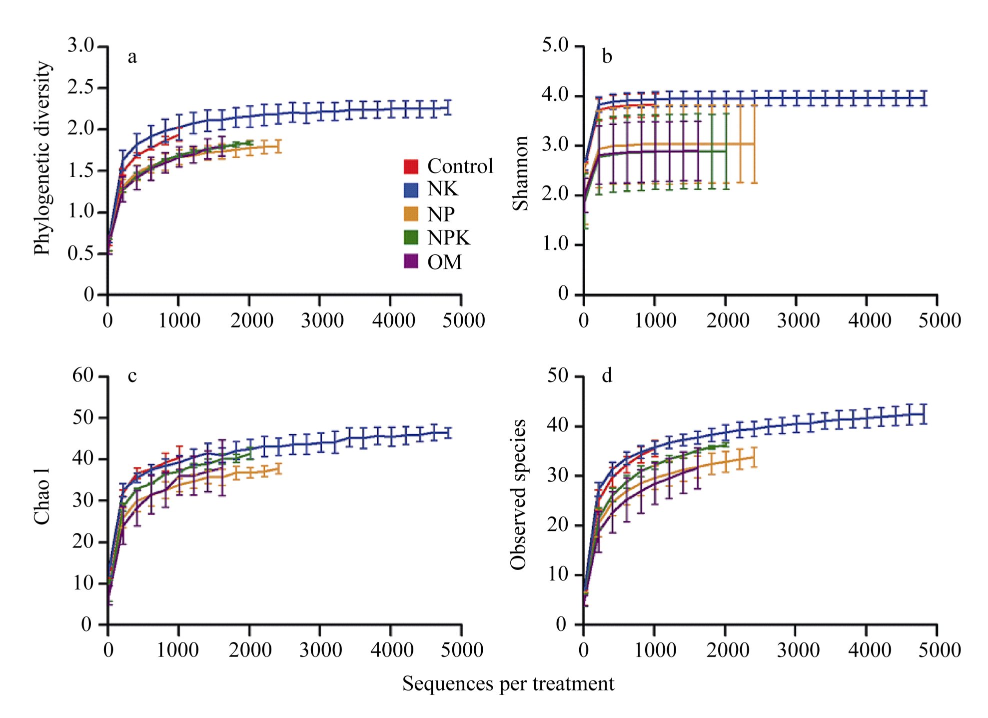


图 17　长期不同施肥处理下潮土丛枝菌根真菌多样性的变化

Fig. 17　Changes of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

不同施肥处理下潮土中 AMF 群落组成如图 18 所示。整体而言，与缺磷施肥 NK 和不施肥的 Control 相比，长期施用磷肥，如 NP、NPK 和 OM，均显著减少了 AMF 的丰富度。具体的物种而言，我们发现 Glomerales 目在各个处理中一直占有最高的比例，而 NP、NPK 和 OM 施肥显著降低了 Acaulosporacea 和 Gigasporaceae 的比例。

为更直观地展示 AMF 群落结构对不同施肥处理的响应，我们进行了 PCA 分析(图 19a)。第 1 主成分因子即 PCA 横坐标的贡献率高达 88.2%，说明横坐标基本可以解释 AMF 群落结构分异的原因。沿着 PCA 横坐标，缺磷施肥的 NK 和不施肥的 Control 与含磷施肥 NP、NPK 和 OM 显著分离。该现象说明磷肥是潮土中 AMF 群落结构分异的主要原因。此外，沿着纵坐标，即第 2 主成分因子(贡献率为 9.9%)，Control 和 NK 中 AMF 的群落结构也存在差异，即说明氮和钾养分的输入对潮土中 AMF 群落结构也存在一定影响。随后，我们关联了环境变量，如土壤 pH、土壤全碳(SOC)和全氮(TN)含量、有效钾(AK)和有效磷(AP)含量、土壤微生物生物量、酶活等和 AMF 群落结构的变化(图 19b)，进行了典范对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)，以揭示哪些土壤理化性质对 AMF 群落结构变化的影响最大，以及 AMF 群落结构变化后对土壤微生物特性的

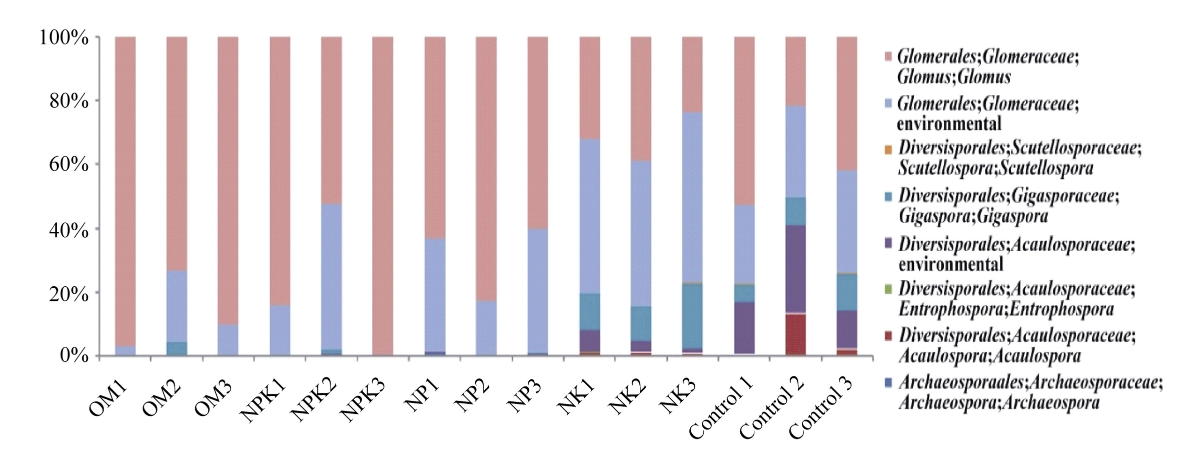


图 18　长期不同施肥处理下潮土丛枝菌根真菌孢子多样性的聚类分析

Fig. 18　Clustering analysis of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

影响。CCA 显示施用磷肥特别是平衡施肥(NPK 和 OM)提升了土壤地力，为作物带来更多的养分；因此，作物对 AMF 的依赖性下降，进而会“舍弃”部分 AMF，例如本研究中的 Gigaspora、Acaulospora、Acaulospora-environmental 和 Scutellospora 等，而将更多的光合产物分配给其他土壤微生物；该过程提高了土壤微生物生物量碳和多种酶活性(图 19b)，可促进土壤养分的循环过程。此外，还发现与土壤物理结构和有机质累积密切相关的易提取球囊霉素与总球囊霉素，其含量在施用磷肥特别是平衡施肥下显著增加(图 20)[11]，且施用有机肥处理高于施化肥处理，即说明平衡施肥，特别是施用有机肥能够通过微生物过程改善土壤物理结构和促进土壤有机质的累积。

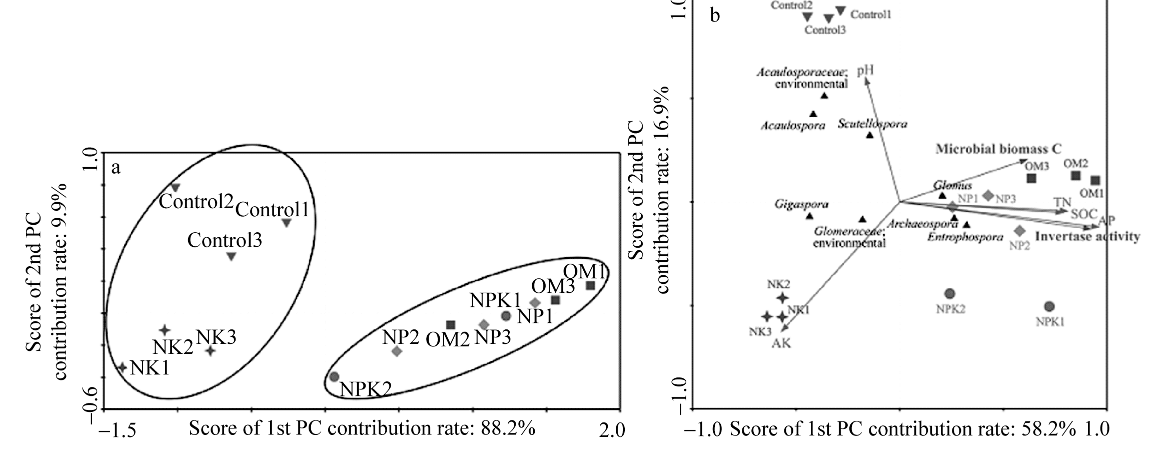


图 19　长期不同施肥处理下潮土丛枝菌根真菌群落结构的 PCA 分析(a)和 CCA 分析(b)

Fig. 19　Principal component analysis (a) and canonical correspondence analysis (b) of arbuscular mycorrhizal fungi community structure in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

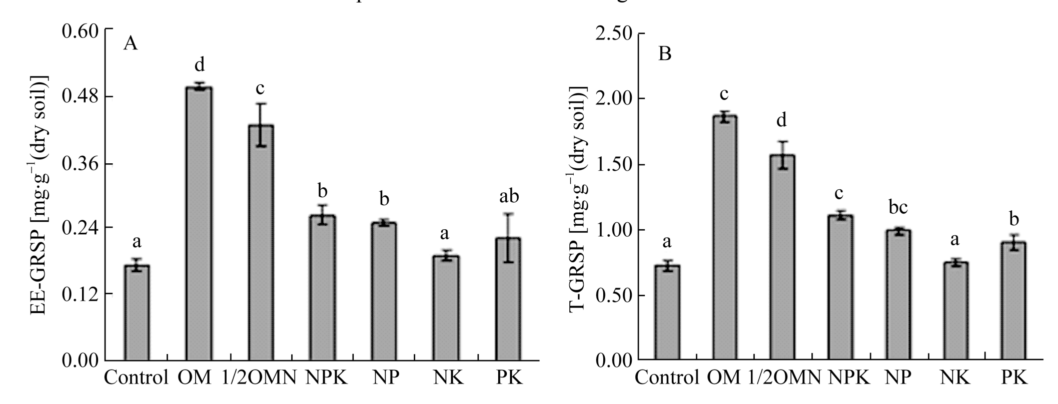


图 20　长期不同施肥处理下潮土土壤可提取球囊霉素(A)和总球囊霉素(B)含量的变化

Fig. 20　Content changes of extractable glomalin (A) and total glomalin (B) in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

3.3　小结

对于缺磷的潮土，长期施用磷肥，尤其是平衡施肥影响了“生物地下交易”过程，特别是与作物生长紧密相关的共生微生物：平衡施肥增加了土壤养分，使得作物对 AMF 的依赖性下降，进而导致土壤中 AMF 多样性下降，群落结构发生分异。该过程使得作物将更多的光合产物调剂给其他微生物，从而改善了土壤化学、物理和生物特性，最终有助于潮土农田地力的可持续性。这一研究结果在国内外首次深度揭示了典型农田土壤中丛枝菌根真菌对不同施肥的响应和反馈，也为我国华北平原的合理施肥提供了理论依据和科学指导。

4　潮土地力提升中的微生物学机制

在前面的研究中，我们发现长期平衡施肥，特别是施用有机肥能够促进潮土碳、氮和磷素转化过程，改善各自相关微生物特性，有助于提升地力和维系其可持续性。但是，具体微生物学机制如何？哪些土壤微生物对施用有机肥料的响应最敏感，即哪些微生物会在有机肥处理中变为优势种群(Who)？这些优势微生物来自哪里，是土著微生物被诱导而来还是从有机肥料中带入(Where)？如果是土著微生物被诱导而来的，它们在施用有机肥多长时间就成为优势微生物(When)？为什么它们会成为优势微

生物(Why)？以及它们发挥着什么功能(What)？这 5 个 W 的回答将会有助于我们从微生物学的角度揭示我国华北平原潮土地力提升的微生物学机制，并指导我们更好地施肥。

相关工作早在 2004 年就已开展。当时我们利用基于细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR-DGGE 指纹图谱技术研究了长期不同施肥对潮土细菌群落的影响(图 21a)[3]。发现施用无机肥不影响细菌条带数和条带强度，但是施用有机肥处理却出现了特异性条带(条带 1)。通过系统发育树分析揭示该特异条带隶属于某个芽胞杆菌 *Bacillus* sp.(图 21b)。但是，由于当时技术和方法等限制，我们无法明确地回答以上 5 个 W。

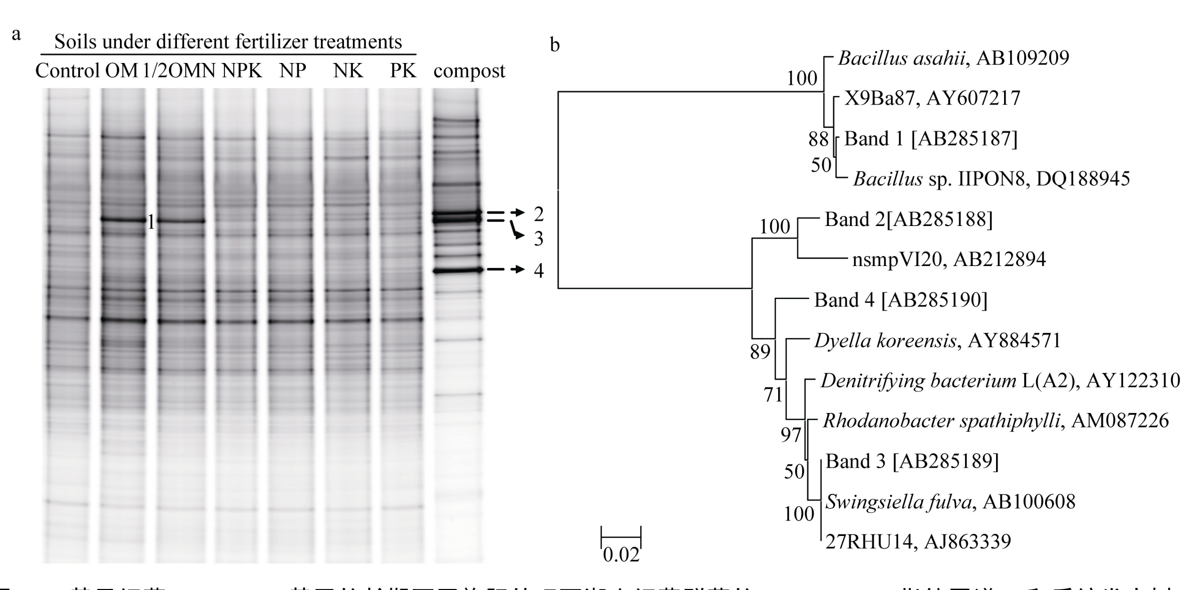


图 21　基于细菌 16S rRNA 基因的长期不同施肥处理下潮土细菌群落的 PCR-DGGE 指纹图谱(a)和系统发育树(b)

Fig. 21　PCR-DGGE Fingerprint Spectrum (a) and phylogenetic tree (b) of bacterial 16S rRNA in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

4.1　*Bacillus asahii* 对长期施用有机肥最敏感

2011 年我们系统研究了潮土细菌，特别是芽孢杆菌对施用有机肥响应的这一科学问题[12]。首先利用高通量测序技术对 2010 年的潮土细菌进行了分析。构建热图，并对门水平分类上的细菌 OTU 组成进行聚类分析(图 22)。不同施肥处理聚类显示施有

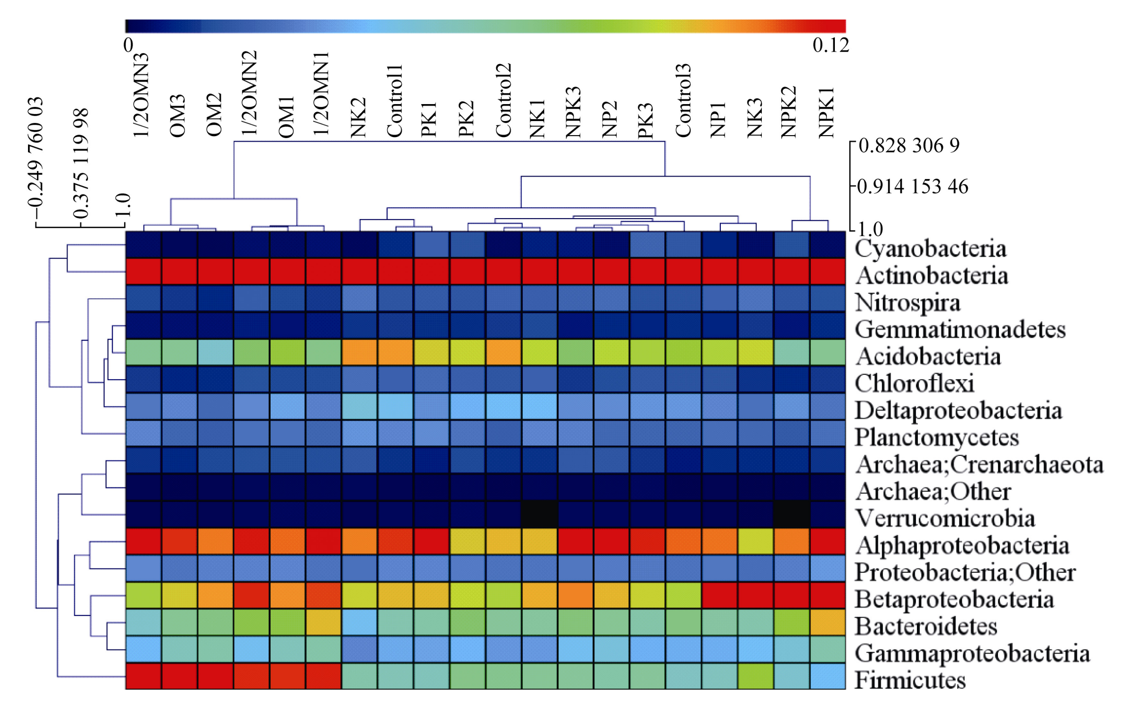


图 22　长期不同施肥处理下潮土细菌群落结构的分层聚类热图

Fig. 22　Hierarchical clustering analysis of bacterial community in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

机肥处理与施化肥处理分别分布于两大分支内，即说明有机肥的施入能够显著改变潮土细菌的群落结构及组成。由细菌物种聚类来看，与 Control 相比，长期施用 OM 和 1/2OMN 均能够显著提高潮土中厚壁菌门的相对含量。该现象说明厚壁菌门内的物种对于外源有机碳的长期投入最为敏感。

对不同施肥处理进行 LEfSe (least discriminant analysis effect size)分析。图中不同颜色代表不同样本或组之间的显著差异物种，每个圆点表示 1 个细菌类群。圆圈从内向外依次表示界(Kingdom)、门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)和属(Genus)级上的分类(图 23)。LEfSe 分析显示潮土细菌组成差异主要集中在 OM、1/2OMN、NK 及 Control 4 个处理之间。具体表现在菌群厚壁菌门、绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门及硝化螺旋菌门，其中以厚壁菌门的差异最为显著。从最外圈的属分级来看，OM 处理主要提高了芽胞杆菌属(*Bacillus*)、微枝形杆菌属(*Microvirga*)、*Arenimonas*、红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)及 *Adhaeribacter* 的比例；1/2 OMN 处理也主要提高了芽孢杆菌属(*Bacillus*)的比例。

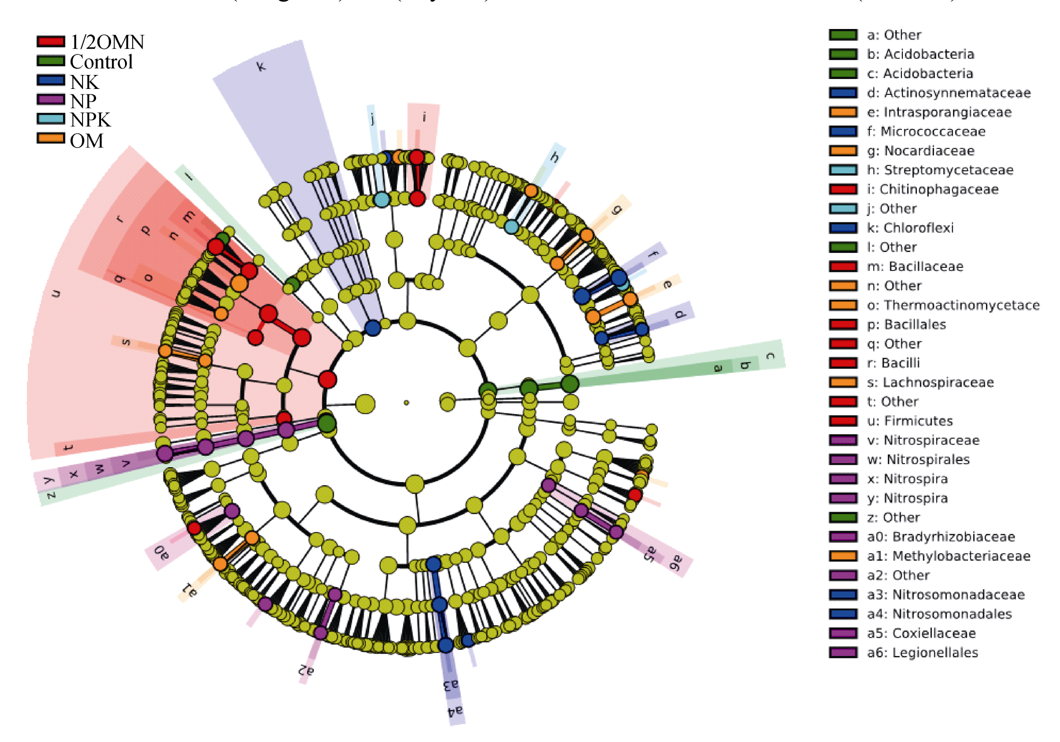


图 **23** 长期不同施肥处理下潮土细菌群落结构的 **LEfSe** 分析

Fig. 23 Analysis result of least discriminant analysis effect size of bacterial community in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

进一步提高分辨率，聚焦在高通量数据中的厚壁菌门(图 24)。我们发现 OM 处理下芽孢杆菌纲在厚壁菌门中的占比高达 92%，而其他施肥处理均不超过 85%，即说明施用有机肥促进了潮土中芽孢杆菌生长。同时 OM 处理下芽孢杆菌纲的物种组成和其他几个处理也大相径庭。虽然高通量测序技术明确地显示潮土厚壁菌门中芽孢杆菌内的物种对施用有机肥最敏感，但是由于该技术获得基因片段只有

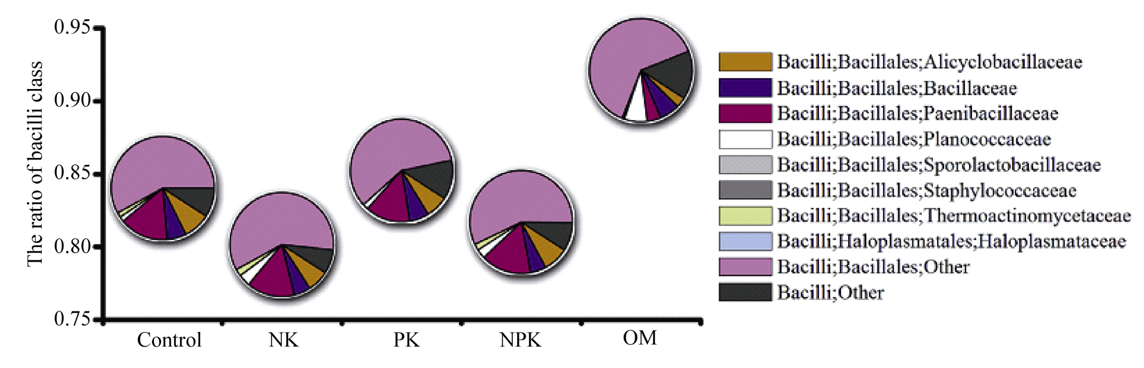


图 **24** 不同施肥处理下潮土芽孢杆菌群落占比和结构变化

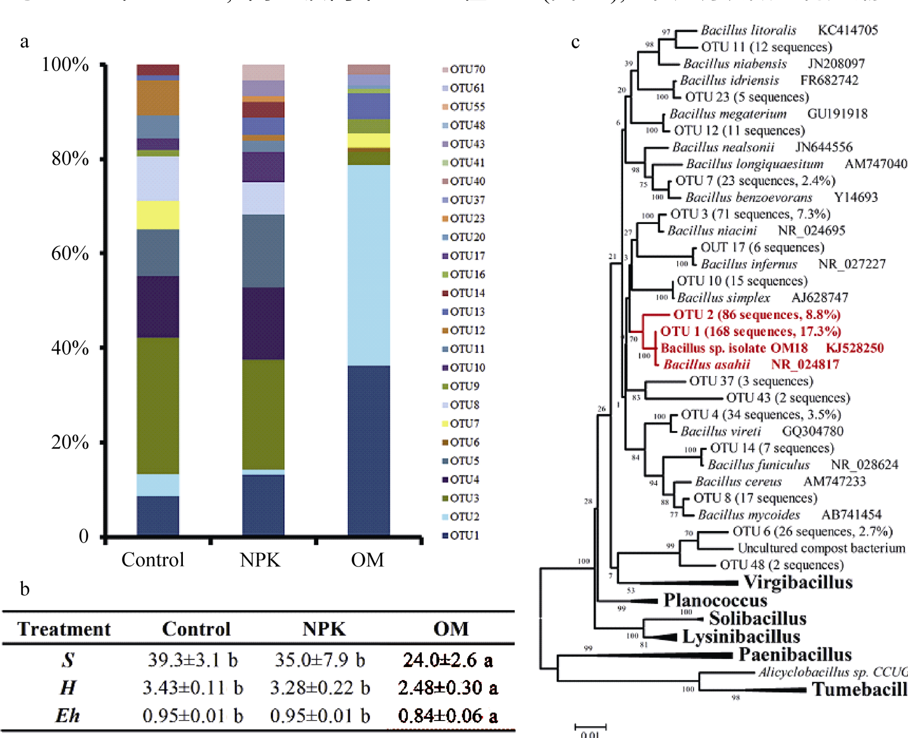
Fig. 24 Composition changes of bacillus community in fluvo-aquic soil under different long-term fertilization treatments

400 bp 左右，其保存的生物信息不足，故无法明确地指示具体物种。因此，我们进一步利用芽孢杆菌核糖体上 1 250 bp 长度的特异性片段来继续跟踪其对施用有机肥的响应。

对 2011 年土壤中的芽孢杆菌群落构建了 1 250 bp 长度的克隆文库(覆盖率为 84.6%)(图 25a)。长期施用有机肥影响了潮土中芽孢杆菌群落结构和多样性。例如 Shannon (*S*), Richness (*H*)和 Evenness (Eh) 3 个多样性指数均在施用有机肥的土壤中下降(图 25b)。但是，OTU1 和 OTU2 从 Control 处理中的 4.2%上升到 OM 处理中的 23.5%和 27.6%，而且该两个 OTU 在 NPK 处理和 Control 处理下并没有差异(图 25a)。系统发育树分析显示 OTU1 和 OTU2 均隶属于 *Bacillus asahii*(图 25c)。通过改进的筛选方案获得了 *B. asahii* 的纯菌也证实了它们是潮土中优势微生物。以上结果一致表明 *B. asahii* 在有机肥处理中已演变为优势种群，长期有机肥的输入刺激其生长，增加了其数量。

4.2　阿氏芽孢杆菌是潮土中土著微生物

为了明确该物种是由有机肥料带入还是土著微生物被诱导，我们对有机肥料中的芽孢杆菌群落进行了克隆文库的分析，发现没有 *B. asahii* (OTU1 和 OTU2) (图 26)，即说明该微生物是潮土中的土著微生物。



Treatment	Control	NPK	OM
S	39.3±3.1 b	35.0±7.9 b	**24.0±2.6 a**
H	3.43±0.11 b	3.28±0.22 b	**2.48±0.30 a**
Eh	0.95±0.01 b	0.95±0.01 b	**0.84±0.06 a**

图 25　长期施用化肥和有机肥下潮土芽孢杆菌群落占比(a)、多样性指数(b)和系统发育树分析(c)

Fig. 25　Composition (a), diversity indexes (b) and phylogenetic tree (c) of bacillus community in fluvo-aquic soil under chemical and organic fertilization treatments

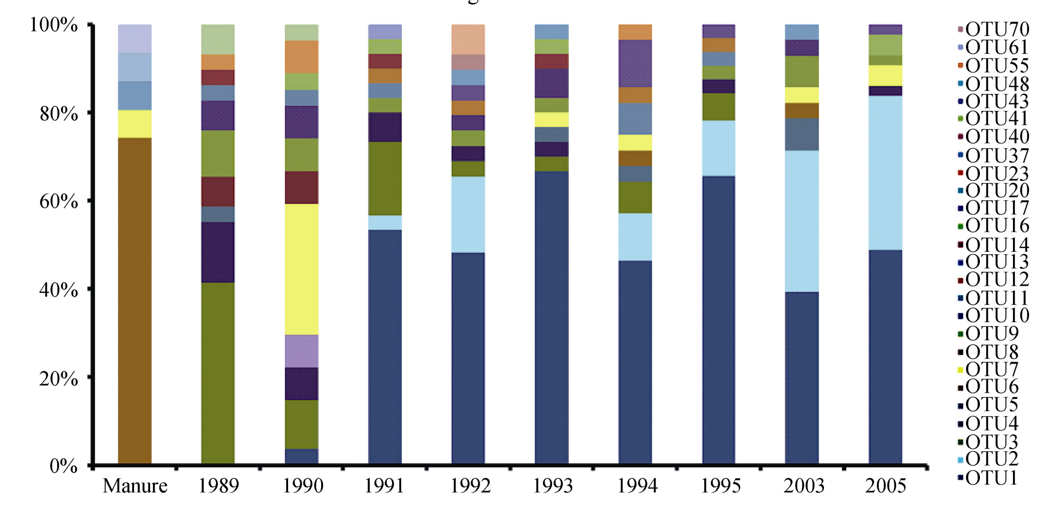


图 26　1989—2009 年间施用有机肥土壤中芽孢杆菌群落演替的克隆文库分析

Fig. 26　Clone library analysis of bacillus community succession in fluvo-aquic soil from 1989 to 2009 under organic fertilization

4.3 施用有机肥 2~4 a 后 *Bacillus asahii* 成为了潮土中的优势微生物

在明确了 *B. asahii* 是由施用有机肥诱导而成为优势土著微生物后，我们进一步对 1989—2009 年施用有机肥土壤中芽孢杆菌群落进行 PCR-DGGE 指纹图谱分析，看施有机肥多长时间就能使它们成为优势微生物？(图 27)。聚类分析显示 21 a 间的芽孢杆菌群落结构经历了 4 个阶段。第 1 个阶段是 1989 年，有机肥的施入使得本底土壤中的芽孢杆菌群落结构发生了最大的变化；第 2 个阶段是 1990—1995 年；第 3 个阶段是 1996—2003；第 4 个阶段是 2004—2009 年。其中，第 3 个阶段和第 4 个阶段的群落结构较为相似，形成了一个分支和第 2 个阶段分开。该现象暗示了芽孢杆菌群落的主要变化发生在 1990—1995 年。对具体条带的分析发现条带 4 于 1993 年出现，到 1994 年后成为了优势条带。系统发育树揭示该条带属于 *B. asahii*，即 DGGE 指纹图谱显 *B. asahii* 于施用有机肥的第 4 年成为了优势微生物。

为了验证 PCR-DGGE 指纹图谱结果的可靠性，我们对 1989—2009 年的土壤芽孢杆菌群落构建了 1 250 bp 长度的克隆文库(覆盖率为 82.4%)。芽孢杆菌物种累计图显示 OTU1 和 OTU2，即 *B. asahii* 在 1991 年成为了潮土中优势微生物，并且在随后的近 20 年间，它在芽孢杆菌中的比例浮动于 40%~72%(图 26)。整合 PCR-DGGE 指纹图谱的信息和克隆文库的结果，我们推测施用有机肥 2~4 a 后使得潮土中一类土著芽孢杆菌 *B. asahii* 成为了优势微生物。

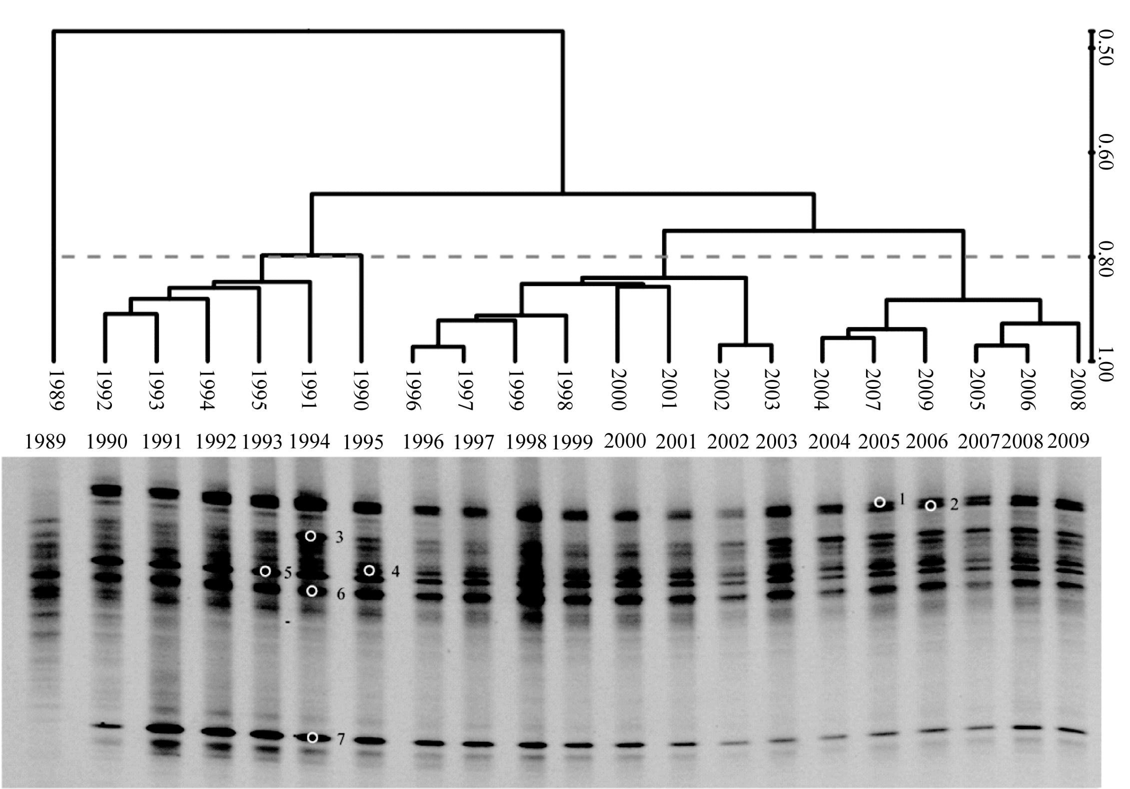


图 27 1989—2009 年间施用有机肥潮土中芽孢杆菌群落演替的 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig. 27 PCR-DGGE fingerprint of bacillus community succession in fluvo-aquic soil from 1989 to 2009 under organic fertilization

4.4 *Bacillus asahii* 的功能研究

在明确了 Who、Where、When 后，我们还想知道 *B. asahii* 为什么会成为优势微生物，以及它们在潮土中的功能如何？我们对获得了 *B. asahii* 的野生型菌株(图 28a, b, c)进行生理生化的测定后，发现该菌有丰富的代谢能力和具有较强的脂类降解能力和解磷能力。该微生物还有别于其他芽孢杆菌，在代谢时不产生有机酸。这些独特的性质可能使它在高有机质输入的碱性土壤中成为优势微生物。回接试验进一步发现该微生物可以提高土壤多酚氧化酶和脂肪酶的活性(图 28d)。这两个酶活性的提高有利于有机肥料中养分的释放，以及土壤地力的提升。

4.5 小结

整合多种分子生物学技术和传统微生物学方法，发现潮土中一种土著微生物 *B. asahii* 对长期施用有机肥的响应最为显著；该物种需要 2~4 a 会成为潮土中优势微生物；该物种有着独特的生理特征和丰富的代谢多样性；它能够加速和促进其他微生物对

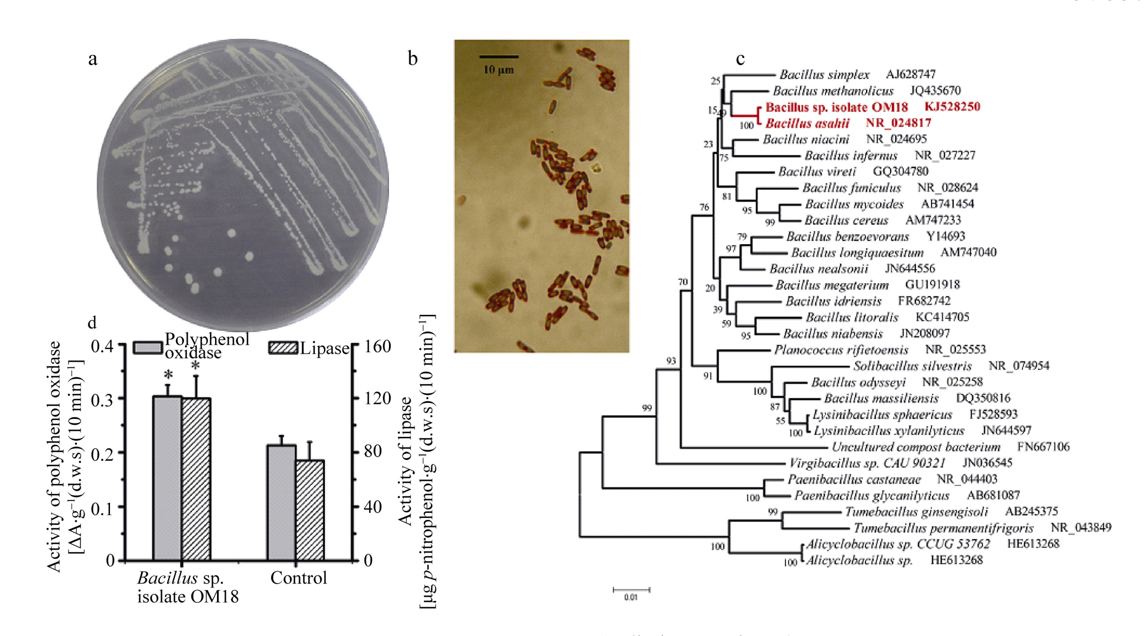


图 28　***Bacillus asahii*** **的鉴定和回接试验**

Fig. 28　Identification and inoculation of *Bacillus asahii*

潮土有机质累积和磷素循环过程, 在作物生长和土壤地力中起到“领军性”的作用。该结果加深了我们对长期施用有机肥提升华北平原地力过程中微生物学机制的认识, 有助于指导调控土壤微生物更好地服务农田生态系统。

5　展望

近年来, 土壤微生物多样性与功能的研究方兴未艾, 进展迅速。人们越来越深入地认识到土壤微生物在农业可持续发展、生态环境保护和全球变化研究中所扮演角色的重要性, 并希望把发展调控土壤微生物技术作为未来环境友好、经济高效农业的新出路。这就给我们提出更为重要的科学任务, 需要我们去应对和挑战。第一, 土壤微生物理论体系需创新。目前最亟待解决的问题是土壤微生物学的理论发展已落后于试验发展。随着新技术和新方法的不断引入, 农田土壤微生物的研究试验取得了丰富的研究结果, 但这些结果大多较为碎片化, 缺少理论的综合和提升。这要求我们多学科交叉发展, 整合扩容已有理论框架, 构建新的理论框架, 利用这些理论体系更好地揭示土壤微生物在农田生态系统中的重要作用。第二, 土壤微生物纵深认识需拓展。多样性和功能耦合是全面评价土壤微生物在农田土壤中作用的基础。目前研究工作主要集中在土壤微生物多样性, 而对于微生物群落物种互作网络、土壤微生物功能基因多样性和功能响应, 特别是定向调控个体微生物功能等方面的研究却相对滞后, 甚至空白。又由于土壤本身的难以观测性, 我们对土壤微结构与微生物之间的互作过程知之甚少, 这就需要我们在微观尺度上原位观测微生物与植物、微生物与土壤中水、气、固三态各种复杂界面之间交互作用。此外, 当前土壤微生物和环境因子的相关性研究较多, 而因果性研究较少。主要原因是缺乏菌株水平的验证试验。土壤微生物学研究, 终须从微生物菌株层面来诠释土壤问题。第三, 土壤微生物研究方法学需提升。尽管近年来新技术和新方法应用于土壤微生物研究中, 为土壤微生物研究注入了活力。但是土壤微生物研究与其他学科相比, 依然落后, 原因之一是研究方法仍相对滞后。这需要我们继续借鉴物理、化学、数学、工程和计算机等领域的先进技术和理念, 发展更多可应用于土壤微生物研究的新技术和新方法; 又由于各种方法都有一定的局限性, 这就需要我们对多种技术方法进行整合和印证; 此外, 我们需要花更大力气研发本学科领域自身的新方法和新技术, 这样才能有更大地发现和突破。第四, 长期试验平台建设需重视。正如本文开头所述, 农业生态系统中很多生态过程的进展相当缓慢, 短期试验不能揭示生态过程的变化趋势。只有持续稳定的长期定位试验才能促进生态学理论的发展, 揭示生态过程的演变机制, 提供科学合理的施肥参数和资源优化管理。因此, 我们必须重视长期试验平台的建设和维护。

参考文献　References

[1] Hvistendahl M. China's push to add by subtracting fertilizer[J]. Science, 2010, 327(5967): 801

[2] 陈长青, 胡清宇, 孙波, 等. 长期施肥下石灰性潮土有机碳变化的 DNDC 模型预测[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(6): 1410–1417

Chen C Q, Hu Q Y, Sun B, et al. Simulating trends in soil organic carbon of in calcareous fluvo-aquic soil under long-term fertilization using the DNDC model[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(6): 1410–1417

[3] Chu H Y, Lin X G, Fujii T, et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(11): 2971–2976

[4] Hu J L, Lin X G, Wang J H, et al. Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer[J]. Journal of Soils and Sediments, 2011, 11(2): 271–280

[5] Zheng S X, Hu J L, Chen K, et al. Soil microbial activity measured by microcalorimetry in response to long-term fertilization regimes and available phosphorous on heat evolution[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(10): 2094–2099

[6] Chen R R, Hu J L, Dittert K, et al. Soil total nitrogen and natural ^{15}Nitrogen in response to long-term fertilizer management of a maize-wheat cropping system in Northern China[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2011, 42(3): 322–331

[7] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(2): 485–491

[8] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, et al. Population size and specific nitrification potential of soil ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(7): 1960–1963

[9] Wang F Y, Hu J L, Lin X G, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal community structure and diversity in response to long-term fertilization: A field case from China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(1): 67–74

[10] Lin X G, Feng Y Z, Zhang H Y, et al. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north China revealed by 454 pyrosequencing[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(11): 5764–5771

[11] Dai J, Hu J L, Lin X G, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity, external mycelium length, and glomalin-related soil protein content in response to long-term fertilizer management[J]. Journal of Soils and Sediments, 2013, 13(1): 1–11

[12] Feng Y Z, Chen R R, Hu J L, et al. *Bacillus asahii* comes to the fore in organic manure fertilized alkaline soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 81: 186–194